

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS

**PERFIL RESISTÓMICO EN MICROBIOMA DE LECHUGA (*Lactuca sativa*) Y
PEREJIL (*Petroselinum crispum*) EN PUNTO DE VENTA EN MERCADOS DE
MONTERREY, N.L. Y SU ÁREA METROPOLITANA.**

POR

L.C.A. DANTE ALDHAIR BETANCOURT MEJORADO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA
EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

JUNIO, 2018

PERFIL RESISTÓMICO EN MICROBIOMA DE LECHUGA
(*Lactuca sativa*) Y PEREJIL (*Petroselinum crispum*) EN PUNTO DE VENTA EN
MERCADOS DE MONTERREY, N.L. Y SU ÁREA METROPOLITANA.

Comité de tesis

Director

Dr. José Santos García Alvarado

Secretario

Dr. Eduardo Franco Frías

Primer Vocal

Dra. Norma L. Heredia Rojas

Segundo Vocal

Dr. Carlos Hernández Luna

Tercer Vocal

Dra. Luisa Yolanda Solís Soto.

Este trabajo fue realizado en Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. José Santos García Alvarado y la asesoría del Dr. Eduardo Franco Frías, Dra. Norma Laura Heredia Rojas, Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna y la Dra. Luisa Yolanda Solís Soto.

El número de beca proporcionada por CONACYT fue 745700

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Biológicas, por poder permitirme realizar este proyecto, sin su apoyo y sin sus facilidades no hubiera podido lograr nada de esto.

Al Dr. Santos, la Doctora Luisa, al Doctor Jorge y la Doctora Norma, por compartir conmigo sus conocimientos y guiarme durante todo este camino.

A mi familia, mis padres, mis hermanos, por todo lo que me han dado, por alentarme a siempre seguir adelante y nunca rendirme, por todo su amor, por todo el buen ejemplo que me han dado a lo largo de mi vida.

A Azalea, por ser un gran soporte en mi vida, por todos sus consejos y por siempre empujarme hacia adelante, por todo su amor y comprensión, su entusiasmo y cariño.

A Eduardo y Ángel, que me han guiado y dado consejos que me fueron de gran ayuda durante todo este proyecto.

A mis profesores por contagiarme con esa pasión por las ciencias, por sus conocimientos que fueron muy útiles para mí, gracias a todo eso, a sus exigencias en sus trabajos he podido llegar hasta aquí, sin sus instrucciones y sus enseñanzas difícilmente estaría donde estoy.

A mis amigos, a Dianelys, Yara, Caro, Alberto, Ángel, Axel, Alfredo, Tonni, Perlita y a todos mis compañeros de generación y del Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos, por todos esos momentos agradables que pasamos, que hicieron de este paso en mi vida una aventura y un semillero de amistades que nunca van a terminar.

Y principalmente a Dios, porque sin Él, nada de esto tendría sentido.

A todos ustedes, mil gracias por todo, éste logro también es suyo, siempre los llevo en el corazón.

DEDICATORIA

A mis padres, Severo Betancourt y Baldramina Mejorado, por su apoyo incondicional desde el comienzo de mi vida, por su constante preocupación e interés en que lograra realizar mis sueños, mis actividades y proyectos, por sus palabras de aliento y sus consejos, por nunca dejarme solo y siempre estar ahí para mí, en las malas y en las buenas, siempre.

A mis hermanos, Cristiam, Severo y Alfa, que me han dado el mejor ejemplo de vida, amigos y compañeros de toda mi vida.

A Azalea, mi compañera de vida, un gran soporte en mi vida.

A mis sobrinos Emiliano, Valentina, Narda, Renata, Renato, Nayita, Lalito, Cristian, que en ellos reside la luz de mi familia.

A Tonni, donde quiera que te encuentres, esto es para ti.

ÍNDICE

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	2
Microbioma.....	2
Microbioma de vegetales	3
Indicadores de contaminación fecal.....	4
Resistoma.....	5
<i>Escherichia coli</i>	8
JUSTIFICACIÓN.....	11
HIPÓTESIS.....	12
OBJETIVOS.....	12
General.....	12
Específicos.....	12
MATERIAL Y MÉTODOS	13
Área de trabajo.....	13
Aislamiento de microbioma y cepas de <i>E. coli</i>	13
Extracción de DNA.....	14
Determinación de genes de resistencia a antibióticos.....	14
Análisis estadístico.	17
RESULTADOS	18
Identificación de genes de resistencia en el resistoma bacteriano.	18
Identificación de genes de resistencia en cepas de <i>E. coli</i>	21
DISCUSIÓN.....	23
CONCLUSIONES.....	27
PERSPECTIVAS	28
BIBLIOGRAFÍA	29
ANEXOS	36

Figuras.	36
Tablas.....	40
RESUMEN BIOGRÁFICO.....	42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos para resistencia a antibióticos.....	23
Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos a utilizar como controles positivos.....	24
Tabla 3. Análisis Tukey-Kramer para tipo de vegetal en resistoma bacteriano de microbioma.....	47
Tabla 4. Análisis Tukey-Kramer para municipios en resistoma bacteriano de microbioma	47
Tabla 5. Análisis Tukey-Kramer por tipo de vegetal en resistoma de cepas de <i>E. coli</i> aisladas....	48
Tabla 6. Análisis Tukey-Kramer para municipios en resistoma de cepas de <i>E. coli</i> aisladas	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Presencia de los genes de resistencia a antibióticos en microbioma total de las muestras analizadas.	26
Figura 2. Porcentaje de genes de resistencia en perejil en resistoma bacteriano de microbioma total.....	27
Figura 3. Porcentaje de genes de resistencia en lechuga en resistoma bacteriano de microbioma total.....	28
Figura 4. Genes de resistencia identificados en cepas aisladas de <i>E. coli</i>	30
Figura 5. Significancia de genes de resistencia por tipo de vegetal del resistoma bacteriano del microbioma total.....	43
Figura 6. Significancia de genes de resistencia por municipio en resistoma bacteriano de microbioma total.....	44
Figura 7. Significancia de genes de resistencia identificados por municipio y por tipo de vegetal en resistoma bacteriano de microbioma total.....	44
Figura 8. Significancia de genes de resistencia por tipo de vegetal en cepas de <i>E. coli</i> aisladas	45
Figura 9. Significancia de genes de resistencia por tipo de vegetal.	45
Figura 10. Significancia de genes de resistencia por tipo de vegetal y municipios..	46

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Simbología	Significado
<i>16SEC</i>	Gen que codifica el 16S ribosomal de <i>Escherichia coli</i>
<i>16SU</i>	Gen que codifica el 16S ribosomal bacteriano
<i>ampC</i>	Genes de Resistencia a Ampicilina.
ARG	Genes de Resistencia a Antibióticos.
<i>blaCARB-4</i>	Genes de resistencia a Carboxipenicilina.
<i>blaOXA-5</i>	Genes de resistencia a Oxacilina.
<i>blaSHV</i>	Genes que codifican para Betalactamasas de Espectro Extendido.
BLEE	Betalactamasas De Espectro Extendido.
<i>ctxm-1</i>	Genes de Resistencia a Cefotaxima.
CDC	Centro de Control y Prevención para Enfermedades.
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
<i>ermA</i>	Genes de resistencia a Eritromicinas clase A.
<i>ermB</i>	Genes de resistencia a Eritromicinas clase B.
<i>ermF</i>	Genes de resistencia a Clindamicina.
GITCH	buffer de amortiguador guanidin tiocianato.
<i>int1</i>	Gen que codifica integrasas clase 1.

<i>int2</i>	Gen que codifica integrasas clase 2.
<i>int3</i>	Gen que codifica integrasas clase 3.
MDR	Cepas Multidroga-Resistentes.
<i>mcr-1</i>	Genes de Resistencia a Colistina.
<i>oriV</i>	Gen que codifica presencia de plásmido incQ (zona de inicio de replicación).
<i>oriT</i>	Gen que codifica presencia de plásmido incQ (zona de inicio de replicación).
<i>parE</i>	Genes de Resistencia a Ciprofloxacina.
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa.
pb	Pares de bases.
<i>qnrA</i>	Genes de resistencia a Fluoroquinolonas clase A.
<i>qnrS</i>	Genes de resistencia a Fluoroquinolonas clase A.
<i>repB</i>	Gen que codifica presencia de plásmido incQ.
<i>sul1</i>	Genes de resistencia a Sulfonamidas.
<i>tetA</i>	Genes de resistencia a Tetraciclinas clase A.
<i>tetB</i>	Genes de resistencia a Tetraciclinas clase B.
TBX	Triptona bilis X-glucurónico.
<i>vanB</i>	Genes de Resistencia a Vancomicina.

RESUMEN

Según los informes de la ONU, el desafío más importante para controlar las enfermedades infecciosas radica en disminuir o erradicar la aparición de bacterias altamente resistentes a antibióticos y, por consecuencia, menos tratables. En países en vías de desarrollo, las infecciones entéricas representan la segunda causa de muerte, especialmente en niños menores de cinco años de edad, donde los microorganismos responsables son a menudo altamente resistentes a antibióticos. Dada la distribución de dichas cepas, se ha vuelto necesario conocer el perfil de resistencia a antibióticos o resistoma de las cepas que se encuentran en algunos de los productos vegetales que nuestra población consume, por lo que en este trabajo se propuso identificar genes de resistencia a antibióticos (ARG) presentes en el microbioma de muestras de lechuga (*Lactuca sativa*) y perejil (*Petroselinum crispum*) vendidas en Monterrey Nuevo León y su área Metropolitana. Se obtuvieron un total de 80 muestras compuestas provenientes de los vegetales recolectados en diversos supermercados (40 muestras de lechuga y 40 de perejil). Se realizó la búsqueda por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de genes de resistencia a antibióticos como *blaCARB-4*, *blaOXA-5*, *blaSHV*, *tetA*, *tetB*, *ermA*, *ermB*, *ermF*, *sul1*, *qnrA*, *qnrS*, *mcr-1*, *ctxm-1*, *ampC*, *parE* y *vanB*. De todas las muestras analizadas se encontró que el gen con más prevalencia fue el gen *sulA* (que codifica para resistencia a sulfonamidas) tanto para perejil como en lechuga. Los genes menos abundantes fueron *blaCARB-4* y *blaOXA-5*. De las mismas muestras se realizaron 46 aislados de *E. coli* a los cuales también se les determinó la presencia de dichos genes, encontrando que el gen *tetA* se presentó en un 39% de los aislados.

En el microbioma total, 21% de las muestras fueron positivas para el gen *sul1*, siendo este el que mostró la prevalencia más alta, seguida de una prevalencia del 13% del gen *tetA*. El municipio que presentó mayor número de genes de resistencia identificados fue Apodaca, así como hubo una mayor incidencia de ARG en el perejil, con un total de 38 muestras compuestas positivas, mientras que para lechuga 25 muestras positivas compuestas; a pesar de las tendencias, no se encontraron diferencias significativas ($\alpha=0.05$) entre los genes, municipios y tipo de vegetal, sólo en las cepas de *E. coli*, donde la comparación entre tipo de vegetal sí arrojó diferencias significativas.

ABSTRACT

According to UN reports, the most important challenge in controlling infectious diseases lies in reducing or eradicating the appearance of bacteria that are highly resistant to antibiotics and, consequently, less treatable. In developing countries, enteric infections represent the second leading cause of death, especially in children under five years of age, where the responsible microorganisms are often highly resistant to antibiotics. Given the distribution of these strains, it has become necessary to know the profile of resistance to antibiotics or resistome of the strains found in some of the plant products that our population consumes, so in this work it was proposed to identify the antibiotic resistance genes (ARG) present in the microbiome of samples of lettuce (*Lactuca sativa*) and parsley (*Petroselinum crispum*) sold in Monterrey Nuevo León and its Metropolitan area. A total of 80 composite samples were obtained from the vegetables collected in various supermarkets (40 samples of lettuce and 40 of parsley). The search was performed using the polymerase chain reaction (PCR) technique on the antibiotic resistance genes such as *blaCARB-4*, *blaOXA-5*, *blaSHV*, *tetA*, *tetB*, *ermA*, *ermB*, *ermF*, *sulI*, *qnrA*, *qnrS*, *mcr-1*, *ctxM-1*, *ampC*, *parE* and *vanB*. It was found that the gene with the most prevalence was the *sulA* gene (which codes for resistance to sulfonamides) for both parsley and lettuce from all the samples analyzed. *blaCARB-4* and *blaOXA-5* was the less abundant genes. 46 isolates of *E. coli* were isolated from the same samples of the research, which were also determined the presence of these genes, finding that the *tetA* gene was present in 39% of the isolates.

In the total microbiome, 21% of the samples were positive for the *sulI* gene, this being the one that showed the highest prevalence, followed by a prevalence of 13% of the *tetA* gene. The municipality that presented the highest number of resistance genes identified was Apodaca, as well as there was a higher incidence of ARG in the parsley, with a total of 38 composite positive samples, while for lettuce 25 composite positive samples; Despite the trends, no significant differences were found ($\alpha = 0.05$) between the genes, municipalities and type of plant, only in *E. coli* strains, where the comparison between type of vegetable did show significant differences.

INTRODUCCIÓN.

Las enfermedades diarreicas constituyen un problema constante de salud pública, siendo responsable de 2.5 millones de casos y 760,000 muertes al año en E.U.A. representando la segunda causa de morbilidad y mortalidad en los niños menores de cinco años de edad (OMS, 2015). Dentro de las bacterias asociadas a estas enfermedades se han reportado a *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, grupos patogénicos de *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., y *Klebsiella* spp entre otras, las cuales colonizan el tracto intestinal pudiendo causar la gastroenteritis.

La aparición de resistencia a antibióticos en las bacterias es el resultado de complejas interacciones entre éstas y su medio ambiente, tal es el caso de la transferencia de genes por diferentes vías (como pueden ser transferencia horizontal, transferencia por plásmidos, toma de genoma libre, y por transposición, entre otras). La resistencia a antibióticos se ha encontrado en diversos tipos de cepas, entre las que se encuentran las enterobacterias, las cuales son comensales propias del intestino de los vertebrados, incluyendo seres humanos, y siendo excretados al medio ambiente, lo cual, al colonizar diferentes nichos pudiera contaminar alimentos, o bien otro medio donde pudiera existir la posibilidad de propagar genes de resistencia a antibióticos.

A nivel mundial, se han reportado bacterias entéricas y no entéricas con resistencia a diversos antibióticos, conocidas como cepas multidroga-resistentes (MDR) circulando en el medio ambiente, desafortunadamente en nuestro país no se cuenta con información suficiente que avale lo anterior. Es por ello que el presente trabajo va dirigido a detectar e identificar genes de resistencia a antibióticos de primera generación en el microbioma total de dos vegetales de consumo común como lo son la lechuga y el perejil.

ANTECEDENTES.

Microbioma

Aunque el término microbioma ha sido utilizado de diversas maneras, por lo general se utiliza para describir el conjunto de microorganismos (bacterias, *Archaeas*, eucariotas y virus) y sus genomas (es decir la totalidad de genes) presentes en un medioambiente dado (Marchesi, J.R. and Ravel, J. 2015), dentro de estos conjuntos de microorganismos se han asociado a las bacterias (microbioma bacteriano) y virus (viroma).

Las plantas albergan consorcios bacterianos taxonómicamente estructurados sobre y dentro de las raíces y las hojas, denominadas microbiota de la raíz y la hoja (Hacquard *et al.*, 2015). La microbiota asociada a hojas se deriva de múltiples fuentes, que probablemente involucren bacterias transmitidas por aerosoles, insectos o partículas de suelo (Bai *et al.*, 2015). Por el contrario, los consorcios bacterianos asociados a las raíces se derivan principalmente de las bacterias presentes en el suelo que rodea las raíces y se establecen rápidamente. Es el suelo el que representa el ecosistema más diverso en la tierra con una variedad de especies bacterianas excepcionalmente alta que varía mucho entre los diferentes tipos de suelos (Berendsen *et al.*, 2012).

No obstante, una serie de prácticas en torno a la producción, cosecha y comercialización de productos alimenticios propician que los vegetales se consuman crudos propiciando que se puedan convertir en vehículo potenciales de microorganismos patógenos, y estos a su vez, y al contener una cantidad de genes de resistencia convirtiéndolo difícilmente tratable (Zhu *et al.*, 2017).

Microbioma de vegetales

Existen muchos géneros de microorganismos asociados a plantas, incluyendo *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Serratia*, *Staphylococcus* y *Stenotrophomonas*. Varios miembros de estos géneros han tenido un papel durante el crecimiento vegetal, así como también propiedades antagonistas contra patógenos de las plantas (Berg *et al.*, 2005). Sin embargo, diversas cepas de los géneros antes mencionados pudieran colonizar órganos y tejidos humanos y por lo tanto causarle enfermedad (Berg *et al.*, 2005).

El número de brotes documentados de infecciones humanas asociadas con el consumo de verduras crudas se ha incrementado en los últimos años (Buck *et al.*, 2003). Diversos patógenos humanos son capaces de colonizar vegetales incluyendo variantes patógenas de *E. coli* (Buck *et al.*, 2003; van Overbeek *et al.*, 2014). Ejemplos bien estudiados de estos grupos son las especies multi-droga resistentes de *Pseudomonas aeruginosa* y *Stenotrophomonas maltophilia*. Ambas se han encontrado como miembros abundantes del microbioma de plantas, y cepas pertenecientes a estas especies se caracterizan por una alta versatilidad genotípica y fenotípica (van Overbeek *et al.*, 2014)

Leff y Fierer (2013), encontraron que en diversos vegetales (lechuga, perejil, col, coliflor, entre otros), albergaban comunidades bacterianas dominadas por los filos *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Proteobacteria*, siendo su composición muy diversa y variada para cada especie de vegetal. Estas diferencias eran a menudo atribuibles a diferencias en las abundancias relativas de enterobacterias (Leff y Fierer, 2013). Esta gran familia de bacterias Gram-Negativas incluye muchos de los más conocidos patógenos entéricos que también juegan un papel importante como patógenos oportunistas (Brandl, 2006; Rastogi *et al.*, 2012).

Indicadores de contaminación fecal

La contaminación fecal en alimentos es, hoy en día, una de las principales vías causantes de brotes de enfermedades por alimentos, debiéndose principalmente a la falta de higiene y malas prácticas de manejo del producto, durante la manipulación en toda la cadena de suministro (Gaze *et al.*, 2013).

Existen distintas bacterias que se consideran como indicadores de contaminación fecal, entre los cuales están *Escherichia coli*, y *Enterococcus faecalis* (Gaze, *et al.*, 2013). El material fecal de animales domésticos, humanos y vida silvestre puede contener microorganismos resistentes a antibióticos, por lo que es de suma importancia conocer las repercusiones que pudiera tener la diseminación de estos microorganismos en el ambiente (Kumperman *et al.* 1983)

Resistoma

La población de genes de resistencia a antibióticos en la naturaleza se conoce como resistoma (Finlay *et al*, 2004). Existe la presencia de un vasto conjunto de genes ambientales con el potencial de ser capturados y expresados como determinantes de resistencia. Sin embargo, se requieren más estudios para establecer una conexión ambiental y clínica (Canton, 2009).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la resistencia a los antibióticos es un problema que está aumentando de forma alarmante en todas partes del mundo. Nuevos mecanismos de resistencia están emergiendo y extendiéndose globalmente, amenazando nuestra habilidad para tratar enfermedades infecciosas comunes (WHO, 2018).

El tratamiento de una creciente lista de infecciones, como neumonía, tuberculosis, gonorrea y enfermedades transmitidas por los alimentos, se vuelve complejo a medida que los antibióticos se vuelven menos efectivos. Esto en parte ha sido debido a la adquisición de antibióticos para uso humano o animal en forma indiscriminada y en muchas ocasiones sin receta médica, provocando la aparición y propagación de la resistencia entre las bacterias. Según el reporte publicado por la OMS en 2018 algunas de las bacterias que han desarrollado resistencia a antibióticos incluyen *Helicobacter pylori* resistente a la claritromicina, *Campylobacter* spp. resistente a las fluoroquinolonas, así como *Salmonella* resistente a las fluoroquinolonas. La mayoría de los antibióticos utilizados para tratar infecciones son producidos por microorganismos ambientales, lo que significa que los genes para la resistencia a los antibióticos también deben haber surgido en hábitats no clínicos (Lesho *et al.*, 2013).

Los expertos médicos ahora están advirtiéndolo que se podría pasar a una era pre antibiótica; una base de datos reciente enumera la existencia de más de 20,000 genes de resistencia potenciales de casi 400 tipos diferentes, predichos en general a partir de las secuencias genómicas bacterianas disponibles (Liu *et al*, 2009).

La resistencia a antibióticos no es de sorprenderse en muchos organismos, como en los actinomicetos productores de antibióticos, ya que poseen genes que codifican para resistencia a los compuestos que producen, así mismo algunos estreptomicetos los cuales producen una variedad de lactamasas, siendo reportados como la fuente de algunas formas clínicas de resistencia a estas enzimas (Farsman *et al*, 1990; Ogawara *et al*, 1990), y como todos estos elementos se encuentran en un ambiente abierto resultaría posible ser transferidos a otros organismos.

En general, el consumo de verduras crudas representa una ruta de exposición humana a las bacterias resistentes a antibióticos y los determinantes de la resistencia que se presentan naturalmente en el suelo. En este aspecto D'Costa *et al*, 2006 aislaron actinomicetos con resistencia a 21 antibióticos diferentes. En las cepas aisladas se identificaron nuevos mecanismos de resistencia entre los que podemos mencionar la acción de quinasas modificadoras de aminoglucósidos y la biosíntesis alternativa de la maquinaria de peptidoglicano, así mismo se aislaron cepas de género *Streptomyces*, *Paenibacillus*, y *Rhodococcus* resistentes a 7 u 8 antibióticos siendo estos vancomicina, eritromicina, minociclina, y cefalexina, entre otros. (D'Costa *et al*, 2006)

Por otra parte, aislados de bacterias Gram-Negativas recuperadas de verduras frescas y ensaladas obtenidas en puntos de venta en Alemania, Finlandia y Estados Unidos revelaron alta incidencia de bacterias con resistencia a antibióticos (70-90%) del tipo beta-lactámicos, ampicilina y cefalotina. Sin embargo, las cepas que expresaban resistencia a otros compuestos antimicrobianos (por ejemplo, aminoglucósidos, tetraciclinas y cloranfenicol) en general fueron menos frecuentes, de 4 a 43% dependiendo de la resistencia al antibiótico en particular (Vaz-moreira, 2014).

En 2017, Zhu y colaboradores investigaron la abundancia y diversidad de genes de resistencia a antibióticos (ARG por sus siglas en inglés) presentes en las comunidades microbianas de lechugas producidas convencional (CPL) y orgánicamente (OPL). Se detectó un total de 134 ARG en la filósfera y el endófito foliar de las muestras.

En su estudio, Martí y colaboradores (2013) investigaron la prevalencia de bacterias con genes de resistencia de vegetales de consumo crudo (tomate, lechuga, zanahoria, pepino, entre otros) en suelo abonado con estiércol y suelo no abonado, donde se detectaron diversos genes de resistencia en el ADN, entre ellos genes de resistencia a eritromicinas, ampicilinas, cefoxitinas, cloranfenicol, etc. extraído de vegetales cultivados en ambos suelos. En general, el consumo de vegetales crudos representa una ruta de exposición humana a bacterias resistentes a los antibióticos y determinantes de resistencia presente de forma natural en el suelo.

Escherichia coli.

Escherichia coli es un microorganismo miembro de la microbiota intestinal de humanos y animales. Algunas cepas poseen un conjunto de factores de virulencia que, pueden afectar procesos celulares provocando como consecuencia enfermedades intestinales y extraintestinales (Boehme, 2004). Se reconocen seis grupos de *E. coli* productores de diarrea (ECD): *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enterotoxigénica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAaggEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) y todos estos son de importancia en alimentos, ya que, al ser indicadores de contaminación fecal, una infección provocada por estas cepas puede causar brotes importantes (Pearson, 2016).

Estos patotipos de *E. coli* se distinguen por la presencia de factores de virulencia (Kaper *et al.*, 2004). Debido a este fenómeno, aunado a cepas patógenas intestinales, se han identificado cepas de *E. coli* extraintestinales causantes de distintos tipos de patologías (Nataro *et al.*, 1998). Todos estos patotipos poseen mecanismos de adhesión e invasión, producción de antígenos y pueden también presentar resistencia a antibióticos.

E. coli es una bacteria que se ha encontrado como responsable de muchos brotes; en el 2011, Slayton y colaboradores identificaron 58 cepas de *E. coli* STEC en distintos casos de un brote en 10 estados de Estados Unidos. De los afectados, 67% fueron hospitalizados y 6,4% desarrollaron síndrome urémico hemolítico, el cuál es una de las principales causas de insuficiencia renal aguda y la segunda causa de insuficiencia renal crónica y de trasplante de riñón en américa latina (Canton, *et al.* 2009). Cualquier consumo de ensaladas que contuvieran lechuga o perejil como ingredientes se asoció significativamente con la enfermedad.

En 2011, Schwaiger y colaboradores realizaron un estudio para dilucidar si los productos frescos de Alemania pueden jugar un papel y en qué medida son transportadoras y reservorio de bacterias resistentes a los antibióticos. Para este propósito, 1001 verduras (fruta, raíz, bulbo verduras, ensaladas y cereales) de 13 granjas y 11 supermercados en Alemania se examinaron bacteriológicamente, encontrando en diversas cepas de bacterias coliformes (entre ellas *E. coli*) perfiles fenotípicos de resistencia antibióticos, principalmente a doxiciclina (23%), eritromicina (21%) y rifampicina (65%), así mismo se conocen cepas de *E. coli* multirresistentes a antibióticos, como es el caso de la resistencia comprobada de la cepa 271 de *E. coli* que portó el gen *blaNDM-1* mediado por plásmido y que contiene el gen de carbapenemasa, un gen de resistencia a antibióticos de última generación (Poirel *et al.* 2011)

La aparición de resistencia a colistina ha levantado la alerta mundial, se requiere información para determinar su prevalencia en diferentes medios, debido a que es uno de los antibióticos de último recurso para el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos multirresistentes. Diversos estudios describen la identificación de genes que codifican para la resistencia a este antibiótico, entre ellos el gen *mcr-I*. Un estudio realizado en Holanda, detectó el gen de resistencia a la colistina *mcr-I* en un aislado de *E. coli*, provenientes de muestras de carne de pollo importada, aislando la muestra de un paciente danés con infección en el torrente sanguíneo (Hasman *et al.*, 2015).

Los antibióticos son compuestos que combaten las infecciones bacterianas. Usados correctamente, pueden salvar vidas, pero hay un creciente problema de resistencia a antibióticos, que si no se pone atención, se podrá tener un problema el cuál va resultar en una situación difícil. La diseminación de la resistencia a antibióticos hacia todo el medio ambiente a causa del mal uso de los antimicrobianos crea un ambiente más que perfecto para que las bacterias puedan conferir y retener todos los factores necesarios, principalmente genéticos, y si estas bacterias pueden tener acceso a nuestros organismos como al consumir un alimento, un vegetal, una ensalada, es necesario tener un panorama sobre las posibles bacterias que pueden abundar en nuestra región, y más principalmente en lechuga y perejil, que son dos de los principales vegetales con mayores reportes de contaminación, así como se encuentran entre los vegetales mas consumidos crudos.

JUSTIFICACIÓN.

Las vegetales como la lechuga y el perejil constituyen una de las principales fuentes de alimentación en la población mexicana dada su aporte de nutrientes y tendencias actuales, sin embargo, debido a que por lo general, a este tipo de productos no se les da un tratamiento térmico posterior y se consumen crudos, o a las malas prácticas de higiene del personal que lo manipula, se pueden acarrear microorganismos patógenos que representen un riesgo para la salud del consumidor y más aún, estos microorganismos pudieran poseer genes de resistencia a antibióticos los cuales también pudieran ser transferibles a otro organismos.

Desafortunadamente, en estos últimos años se ha observado un incremento en la resistencia de las cepas bacterianas a antibióticos de uso común, debido esto en parte al uso inapropiado de los mismos a diversos niveles de la cadena granja a la mesa.

En este rubro, existe poca información en torno a la presencia de genes de resistencia a antibióticos prevalecientes en el microbioma bacteriano de vegetales que se consumen frescos por lo que el presente proyecto se enfoca en la detección de genes de resistencia a antibióticos en el microbioma y en cepas de *E. coli* de muestras de lechuga (*L. sativa*) y perejil (*P. crispum*) adquiridas directamente en punto de venta de Monterrey Nuevo León y su área metropolitana.

HIPÓTESIS.

Existe una diversidad de genes de resistencia a antibióticos presentes en el microbioma de lechuga y perejil y en cepas de *E. coli* aisladas en punto de venta en supermercados de Monterrey, N.L.

OBJETIVOS.

General

Identificar genes de resistencia a antibióticos presentes en el microbioma de muestras de lechuga (*L. sativa*) y perejil (*P. crispum*) en punto de venta en supermercados del área metropolitana de Monterrey, N.L.

Específicos.

- Extraer el genoma bacteriano de muestras de lechuga y perejil adquiridas en puntos de venta de supermercados del área metropolitana de Monterrey, N.L.
- Evaluar el perfil resistómico del microbioma bacteriano de lechuga y perejil.
- Aislar a *E. coli* de las muestras analizadas y determinar su perfil resistómico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Área de trabajo.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Se realizó un muestreo aleatorio según la cantidad de habitantes de los 7 municipios más poblados del área metropolitana de Monterrey, Nuevo León. La relación se hizo en base al número de habitantes por lo que entre una mayor cantidad de habitantes, mayor fue la cantidad de muestras levantadas. Las muestras se denominaron compuestas debido a que cada una estuvo conformada por 4 perejiles o 4 lechugas. De acuerdo al número de habitantes, de Monterrey se tomaron 10 muestras compuestas, seguidas de Guadalupe con 8, Apodaca y San Nicolás con 5, en tanto que Escobedo, Santa Catarina y San Pedro fueron 4, dando un total de 40 muestras compuestas de lechuga y lo mismo de perejil con una totalidad de 160 perejiles y 160 lechugas.

Aislamiento de microbioma y cepas de *E. coli*.

Para el aislamiento tanto del microbioma como de las cepas de *E. coli*, se utilizó el método descrito por Heredia y colaboradores (2014), el cual se describe brevemente a continuación. Se colocaron los vegetales en bolsas estériles y se agitaron con 500 ml de agua peptonada al 0.1% por 60s manualmente. Posteriormente, el agua de este lavado (de 200 a 300 ml) se filtró a través de una membrana de 0.45µm de poro y 47mm de diámetro (S-Pak, Merck Millipore) utilizando un sistema de filtración al vacío (Pall Corp., Port Washington, NY). La membrana obtenida se colocó en un tubo Falcon de 15 ml con buffer de amortiguador guanidin tiocianato (GITCH por sus siglas en inglés) (4M guanidin Tiocianato, Sarkosyl 2%, 50mM Tris, 10mM EDTA) Martí *et al.* 2013) para la extracción de DNA de las muestras.

Para el aislamiento de *E. coli* se realizó el mismo procedimiento sin embargo una membrana en esa ocasión fue inoculada en una placa de agar TBX (por sus siglas en inglés, triptona bilis X-glucuronido, DIFCO) la cual fue incubada a 36°C por 24h. Al final del periodo de incubación, las colonias características de *E. coli* que presentaban un color verde azulado, fueron aisladas y resuspendidas en 2 ml del buffer GITCH

Extracción de DNA.

La extracción del DNA total tanto de la membrana como las cepas aisladas de *E. coli* se realizó utilizando un sistema comercial DNeasy blood and tissue kit marca QIAGEN siguiendo la técnica descrita por el proveedor.

Determinación de genes de resistencia a antibióticos.

La determinación de los genes de resistencia a antibióticos se realizó acorde a la metodología de PCR propuesta por Martí *et al.* (2013) con breves modificaciones las cuales se describen a continuación. El volumen final de reacción fue de 25µl, el cual contenía 2U Taq polimerasa (BIOLINE), 1.5mM MgCl₂, 1mM de dNTP (BIOLINE), 5µl del buffer de reacción 10X, 2µl del DNA templado, 500 nM de cada oligonucleótido los cuales se obtuvieron de la literatura (Tabla 1)

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos para resistencia a antibióticos.

Blanco	Oligonucleótido	Secuencias	Tamaño del producto (pb)
Beta lactamasas	<i>blaCARB-4</i>	5' TAATAGAAAAGCAAGTAGGA 3'	435
		5' AACTATGATTGGGGATTGAG 3'	
	<i>blaOXA-5</i>	5' AGCCGCATATTTAGTTCTAG 3'	663
		5' ACCTCAGTTCCTTTCTCTAC 3'	
	<i>blaSHV</i>	5' GGTTATGCGTTATATTCGCC 3'	867
		5' TTAGCTTTGCCAGTGCTC 3'	
Tetraciclinas	<i>tetA</i>	5' GCGGTCTTCTTCATCATGC 3'	502
		5' CGGCAGGCAGAGCAAGTAGA 3'	
	<i>tetB</i>	5' CATTAATAGGCGCATCGCTG 3'	930
		5' TGAAGGTCATCGATAGCAGG 3'	
Macrólidos	<i>ermA</i>	5' GTTCAAGAACAATCAATACAGAG 3'	421
		5' GGATCAGGAA AAGGACATTTTAC 3'	
	<i>ermB</i>	5' CCGTTTACGAAATTGGAACAGGTAAAGGGC 3'	359
		5' GAATCGAGACTTGAGTGTGC 3'	
Clindamicina	<i>ermF</i>	5' TCGTTTTACGGGTCAGCACTT 3'	182
		5' CAACCAAAGCTGTGTCGTTT 5'	
Sulfonamidas	<i>sul1</i>	5' GTGACGGTGTTTCGGCATTCT 3'	779
		5' TCCGAGAAGGTGATTGCGCT 3'	
Fluoroquinolonas	<i>qnrA</i>	5' ATTTCTCA CGCCAGGATTTG 3'	516
		5' GATCGGCAAAGGTTAGGTCA 3'	
	<i>qnrS</i>	5' CAATCATACATATCGGCACC 3'	388
		5' TCAGGATAAACAACAATACCC 3'	
Colistina	<i>mcr-1</i>	5' GCAGCATACTTCTGTGTGGTAC 3'	554
		5' TATGCACGCGAAAGAACTGGC 3'	
Cefotaxima	<i>ctxm-1</i>	5' GGTTAAAAAATCACTGCGTC 3'	863
		5' TTGGTGACGATTTTAGCCGC 3'	
Ampicilina	<i>ampC</i>	5' GGAATGCTGGATGCACAA 3'	643
		5' CATGACCCAGTTCGCCATATC 3'	
ciprofloxacina	<i>parE</i>	5' TACCGAGCTGTTCTTGTGG 3'	265
		5' GGCAATGTGCAGACCATCA 3'	
Vancomicina	<i>vanB</i>	5' GTGACAAACCGGAGGCGAGGA 3'	433
		5' CCGCCATCCTCCTGCAAAAAA 3'	

Así mismo se utilizaron oligonucleótidos específicos para secuencias especiales, las cuales incluyen genes de 16S ribosomal específico para *E. coli*, 16S ribosomal bacteriano universal, integrasas de tres clases (*int1*, *int2* e *int3*) y para detectar sitios de replicación de plásmidos comunes portadores de genes de resistencia a antibióticos (Tabla 2).

Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos a utilizar como controles positivos.

Blanco	Oligonucleótido	Secuencias	Tamaño del producto (pb)
16S <i>E. coli</i>	<i>16SEC</i>	5' CCCCCTGGACGAAGACTGAC 3'	195
		5' ACCGCTGGCAACAAAGGATA 3'	
16S Universal	<i>16SU</i>	5' CAGGCCTAACACATGCAAGTC 3'	1300
		5' GGGCGGWGTGTACAAGGC 3'	
Integrasas	<i>int1</i>	5' CCTCCCGCACGATGATC 3'	280
		5' TCCACGCATCGTCAGGC 3'	
	<i>int2</i>	5' TTATTGCTGGGATTAGGC 3'	233
		5' ACGGCTACCCTCTGTTATC 3'	
	<i>int3</i>	5' AGTGGGTGGCGAATGAGTG 3'	600
		5' TGTTCCTTGATCGGCAGGTG 3'	
IncQ (Plásmido)	<i>repB</i>	5' TCGTGGTCGCGTTCAAGGTACG 3'	1660
		5' CTGTAAGTCGATGATCTGGGCGTT 3'	
	<i>oriV</i>	5' CTCCCGTACTAACTGTCACG 3'	436
		5' ATCGACCGAGACAGGCCCTGC 3'	
	<i>oriT</i>	5' TTCGCGCTCGTTGTTCTTCGAGC 3'	191
		5' GCCGTTAGGCCAGTTTCTCG 3'	

Para todos los genes las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización 4 min a 94° C, seguido de 30 ciclos de 5s a la temperatura de alineación adecuada de cada oligonucleótidos indicada por Martí y colaboradores (2013) (16SEC 55 °C, 16SU 55 °C, *blaCARB-4* 42.5 °C, *blaOXA-5* 43 °C, *blaSHV* 44 °C, *tetA* 60 °C, *tetB* 48 °C, *ermA* 53 °C, *ermB* 55 °C, *ermF* 60 °C, *sulI* 50 °C, *qnrA* 47.5 °C, *qnrS* 60 °C, *mcr-1* 55 °C, *ctxm-1* 60.5 °C, *ampC* 52 °C, *parE* 50.5 °C, *VanB* 56 °C, *int1* 49 °C, *int2* 54 °C, *int3* 55 °C, *repB* 60 °C, *oriV* 46.8 °C, *oriT* 48 °C) y 20s a 59° C y un paso final de extensión de 5 min a 72°C, se llevaron a cabo en un termociclador ThermoHybaid (Modelo HBPX110).

Los productos de la amplificación fueron separados en un gel de agarosa al 1.5% con una corriente de 80V y se visualizaron al ser teñidos con bromuro de etidio (50µg/ml) bajo luz UV y los geles fueron fotografiados usando un Gel Logic 200, Imaging System, Kodak.

Análisis estadístico.

Se aplicó estadística descriptiva para analizar los datos obtenidos, además de un análisis ANOVA gl 1,6, y comparación Tukey-Kramer, con una significancia $\alpha=0.05$, para analizar la existencia de una diferencia significativa entre los resultados para cada tipo de vegetal.

RESULTADOS

Identificación de genes de resistencia en el resistoma bacteriano.

Se analizó un total de 80 muestras compuestas (40 de lechuga y 40 de perejil) para realizar la búsqueda de 16 genes asociados a resistencia antibióticos de diferentes clases.

La búsqueda de los genes presentes en el microbioma total arrojaron un total de 65 genes de los cuales 40 (61.53%) estuvieron presentes en el microbioma de perejil y 25 (38.46%) en lechuga de los cuales el gen que más se encontró fue el de resistencia a sulfonamidas *sul1* en 10 muestras que representan el 15.38% del total de genes de resistencia encontrados, seguido por el gen para resistencia a tetraciclinas *tetA* y fluoroquinolonas *qnrA* y de los genes que no se encontraron fueron los que codifican para resistencia a betalactámicos (*blaCARB-4* y *blaOXA-5*) así como para colistina *mcr-1*

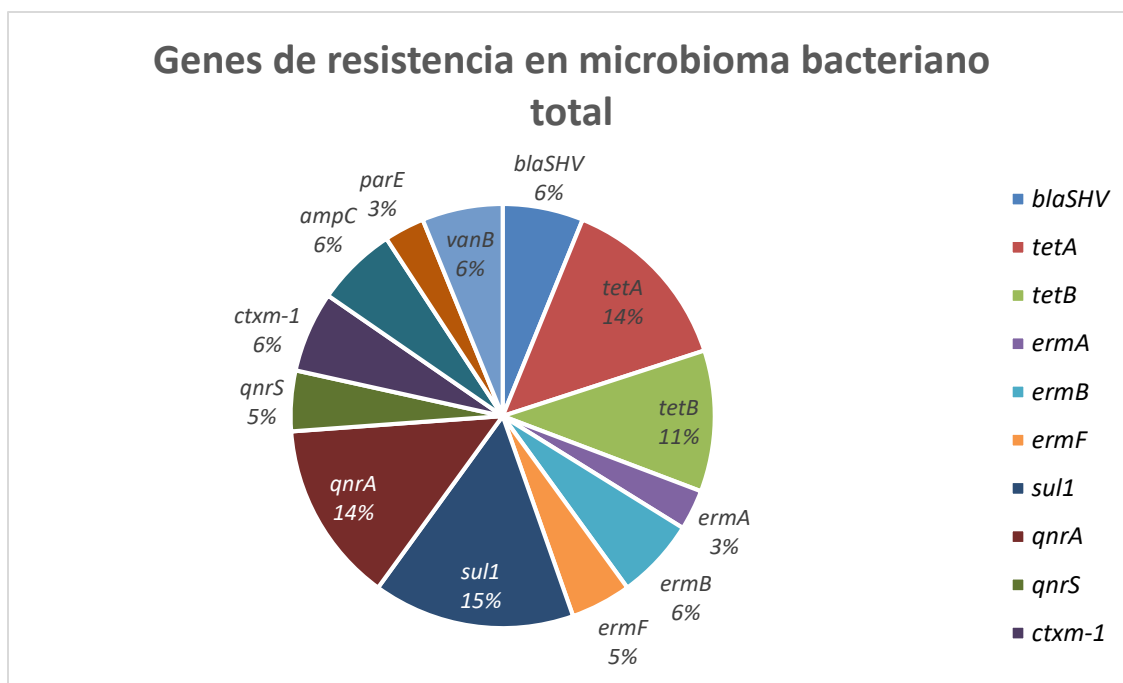


Figura 1. Presencia de los genes de resistencia a antibióticos en microbioma total de las muestras analizadas.

Al realizar el análisis comparando entre vegetales, encontramos que hay una presencia variada de genes de resistencia para cada vegetal, siendo en perejil el gen *sul1* fue el de mayor presencia en perejil el, mientras que en lechuga fue el *tetb*, sin embargo, los análisis estadísticos mostraron que no se presentaron diferencias significativas entre uno y otro vegetal ($P < 0.05$) esto podemos verlo en la sección de anexos.

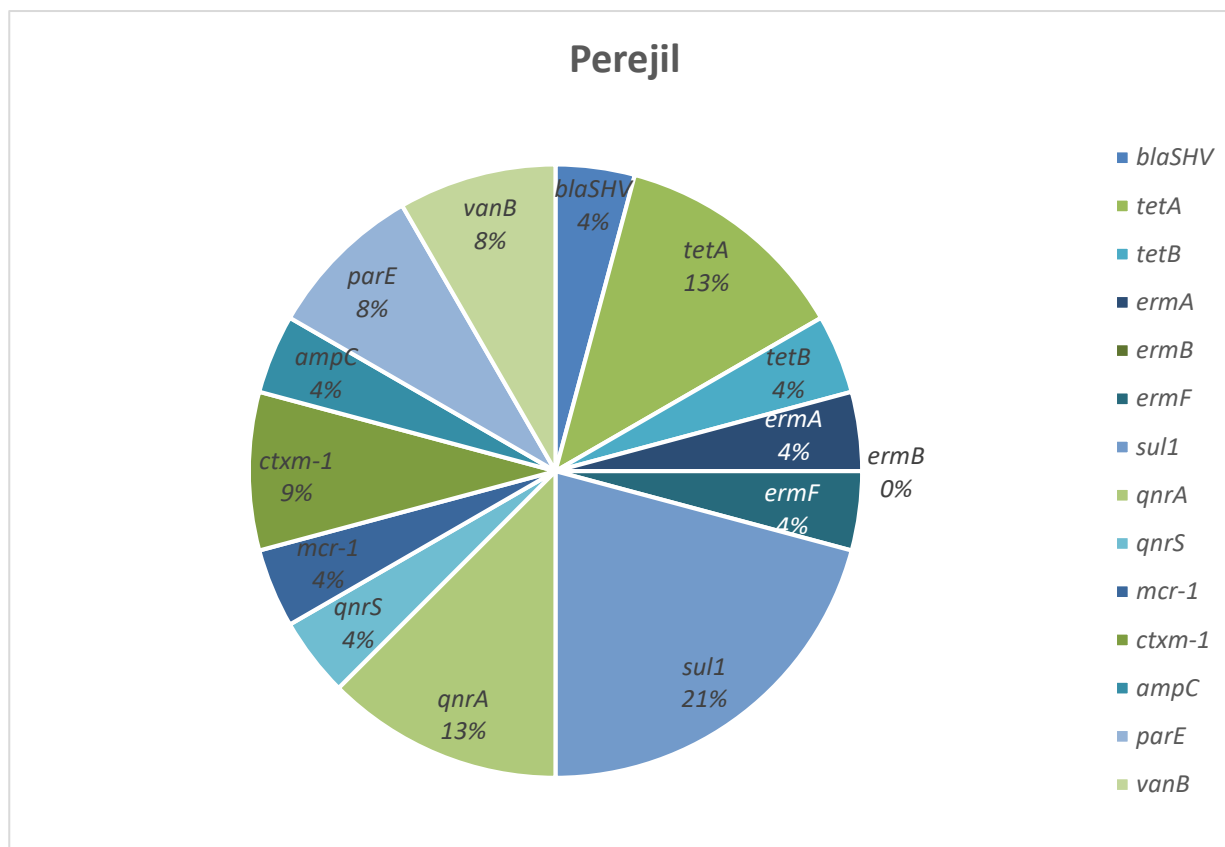


Figura 2. Porcentaje de genes de resistencia en perejil en resistoma bacteriano de microbioma total.

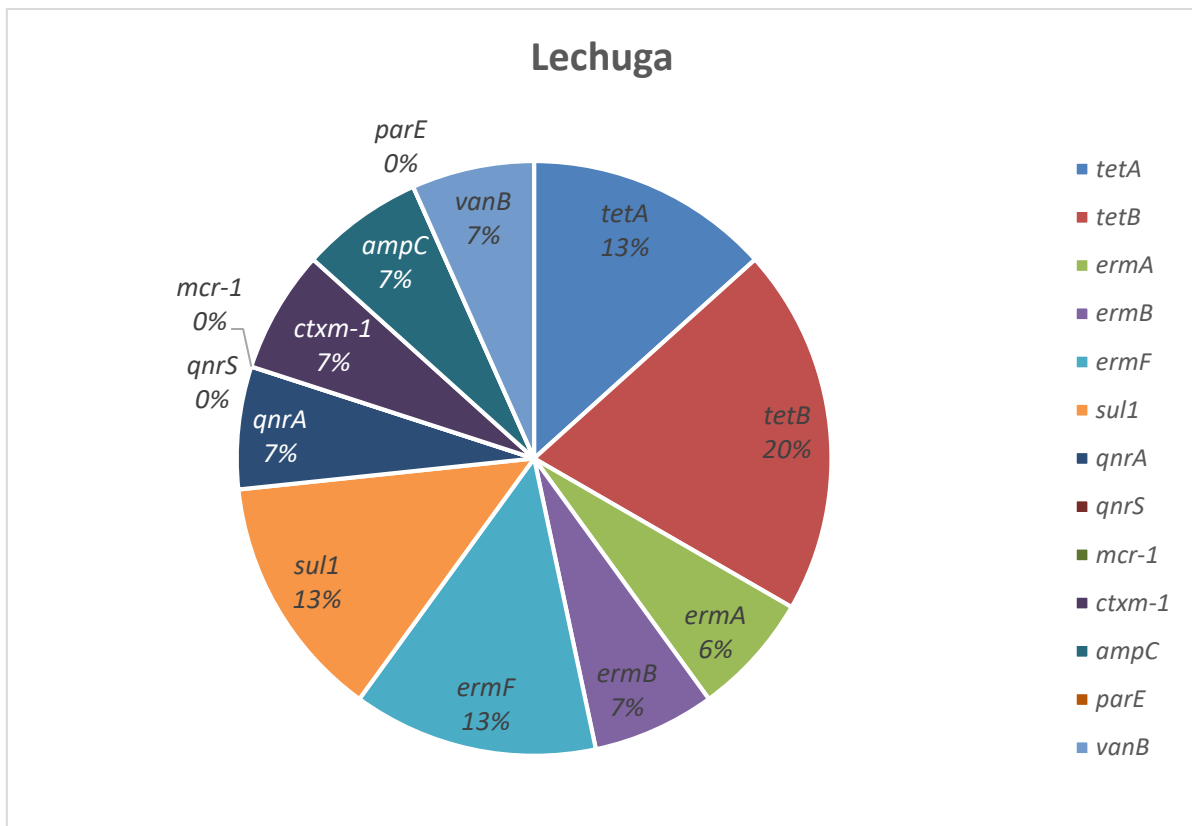


Figura 3. Porcentaje de genes de resistencia en lechuga en resistoma bacteriano de microbioma total.

Los análisis estadísticos ($P < 0.05$) mostraron que no se presentaron diferencias significativas, a pesar de observar diferencias marcadas en los valores entre los vegetales.

Identificación de genes de resistencia en cepas de *E. coli*.

De las muestras analizadas, se aislaron un total de 46 cepas de *E. coli* de las cuales, 34 (73.9%) provenían de perejil y 12 (26.08%) a lechuga.

En estas cepas de *E. coli* se logró la identificación de un total de 12 genes de resistencia a antibióticos, siendo el más abundante el gen *tetA* que codifica para tetraciclinas de clase A, el cual se logró identificar en 5 aislados representando una proporción del 41.67% del total de genes. Seguido de los genes de *blaSHV*, y *qnrA*, codificando para betalactamasas SHV, y fluoroquinolonas de clase A respectivamente, todos con una proporción del 16.66% finalizando con los genes *ermA*, *ermF* y *qnrS* codificando para genes de resistencia a eritromicina de clase A y fluoroquinolonas de clase S y clindamicina, ambas con un porcentaje del 8.33%. (Figura 4).

En cuanto a los vegetales, de los 12 genes identificados sólo 1 de una muestra de lechuga y fue el gen *tetA* que codifica para tetraciclinas de clase A, los 11 genes restantes identificados estuvieron presentes en las muestras de perejil.

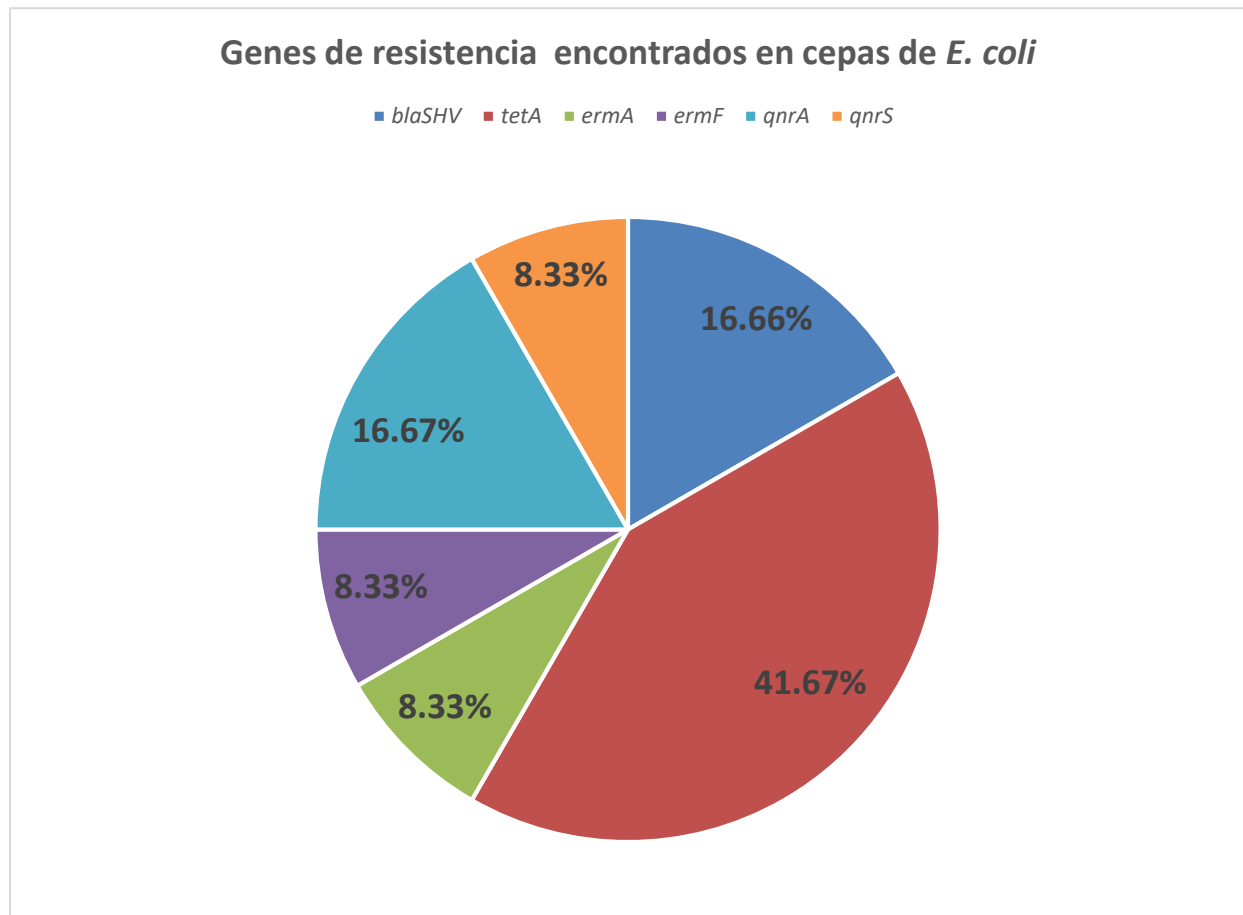


Figura 4. Genes de resistencia identificados en cepas aisladas de *E. coli*.

Los resultados al comparar los tipos de vegetal nos indicaron diferencias significativas ($P < 0.05$). Esto puede ser debido a que se buscaron pocos genes en las cepas de *E. coli*.

En el caso de la prevalencia de estos genes entre los dos tipos de vegetales analizados, no observaron diferencias ya que en lechuga solo se encontró un gen de resistencia, a diferencia de los 12 genes encontrados para el perejil en las cepas de *E. coli* aisladas de dichos productos.

DISCUSIÓN

El CDC estima que cada año 48 millones de personas se enferman por microorganismos patógenos transportados por los alimentos, 128 000 son hospitalizadas y 3000 mueren, muchos de éstos a causa de la ineffectividad de los antibióticos sobre las bacterias responsables debido a la alta tasa de mutación de las mismas (CDC, 2013).

En nuestro caso realizamos la búsqueda de genes de resistencia a antibióticos presentes en el microbioma de muestras de perejil y lechuga que se expenden en supermercados de Monterrey N.L. y su área metropolitana. De un total de 40 muestras de cada producto encontramos mayor incidencia de genes de resistencia en perejil (91.% en cepas de *E. coli* y 42% en resistoma bacteriano total) en comparación con lo encontrado en lechuga (9% en cepas de *E. coli* y 38% en resistoma bacteriano total) lo cual contrasta con lo reportado en la literatura ya que se ha observado una mayor presencia de genes de resistencia a antibióticos en muestras de lechuga, como lo reportado por Martí y colaboradores en 2013 quienes encontraron mayor incidencia de genes de resistencia en lechuga, tomate y otros vegetales, descartando al perejil.

En nuestro trabajo en 49 muestras (38 de microbioma total y 11 de los aislados de *E. coli*) de perejil se encontraron con diversos genes de resistencia. Aunque la resistencia a los antibióticos es un fenómeno natural, el uso indebido de estos fármacos en el ser humano y los animales está acelerando el proceso. Como se había mencionado antes, muchos autores indican que la alta incidencia de genes de resistencia tiene una estrecha relación con altos niveles de contaminación (Leff y Fierer *et al.* 2013), tal es el caso de lo reportado por Heredia y colaboradores (2012) donde después de analizar niveles de contaminación de distintos vegetales en el área metropolitana de Monterrey (tomate, lechuga perejil, chile serrano, entre otros), se identificaron mayores niveles de contaminación en perejil, sugiriendo que la presencia de resistencia en un vegetal de consumo puede deberse a causa de un mayor nivel de contaminación, indicándonos un microbioma diverso y basto, que pudiera servir para promover todos los mecanismos de transmisión de genes entre ellos.

El alto índice de contaminación en perejil puede ser causado por contaminación post cosecha, ya que si no se toman medidas adecuadas y no hay capacitación del personal, es posible contaminación cruzada, en cambio las lechugas tipo iceberg generalmente se venden con un recubrimiento plástico, lo que las hace mucho menos susceptibles a contaminación post cosecha.

Reportes actuales no indican un alto número de genes de resistencia en muestras de perejil, sin embargo, existen estudios donde se han relacionado a brotes de importancia, como lo reportado por Niami (2002), donde estuvo relacionado con brotes que ocurrieron en 8 restaurantes de E.U.A y Canadá.

El CDC en su reporte con respecto a resistencia a antibióticos en el 2013, colocó a los genes de resistencia a tetraciclinas, vancomicinas y ampicilinas como los más distribuidos a nivel mundial, lo cual concuerda con lo identificado en este trabajo, en donde fueron detectados los más altos niveles de incidencia de genes de resistencia a las tetraciclinas de clase A (*tetA*) con 14 % en el microbioma bacteriano total y 41.66% en cepas de *E. coli*.

Recientemente (2017), el CDC reportó el fallecimiento de una mujer del estado de Nevada, Estados Unidos, por una infección por consumo de alimento causada por una cepa de *Klebsiella pneumoniae* resistente a todos los 26 antibióticos disponibles avalados por la FDA.

A pesar de las diferencias marcadas encontrada en relación a la presencia de genes de resistencia encontrados para cada tipo de vegetal, nuestros análisis no encontraron diferencias significativas contra el análisis del microbioma total. Al analizar el porcentaje de cada gen de resistencia se destacó la presencia de genes de resistencia a sulfonamidas (15%), así como de tetraciclinas (14%) en ambos vegetales. Es importante mencionar que la presencia de la mayor parte de genes de resistencia encontrados provenían de muestras de perejil.

Reportes previos contrastan con lo reportado en este trabajo ya que Boehme (2004), al analizar muestras provenientes de Países Bajos, identificó a genes de resistencia a ampicilinas en distintos vegetales entre los cuales se encontraban perejil y lechuga como los más frecuentes. Esta diferencias pudiera deberse a cambios de microbioma de esta región, desde su producción, manipulación en post cosecha, así como su manipulación dentro del punto de venta.

Los genes de resistencia para carboxipenicilina (*blaCARB-4*) y oxacilina (*blaOXA-5*) no se encontraron en ninguna muestra, lo cual contrasta con otros estudios en donde se han identificado en al menos un vegetal (Martí *et al*, 2013). Esto puede explicarse principalmente por la diversidad de factores que pueden favorecer la diseminación de la resistencia a antibióticos tales como climas, y ecosistemas variantes en las regiones geográficas os (Dresser *et al*, 2006). La resistencia a penicilina, ha sido reportado ser de alrededor de 55% en México, que es superior a la mostrada por otros países de Latinoamérica como Argentina y Brasil.

Recientemente diversos estudios han encontrado cepas de *E. coli* resistentes a ampicilina y tetraciclinas (Miranda-Estrada *et al*, 2017). Con estos datos podemos observar la diferencia y diversidad encontrada en los distintos consorcios microbianos de diversas localidades geográficas, donde aun siendo las mismas matrices vegetales, los resultados tienen cambios remarcables.

Es importante recalcar que en lo encontrado en este estudio la prevalencia de genes de resistencia de las cepas de *E. coli* disminuyó; lo cual difiere a lo reportado por Martí (2013), donde las cepas de *E. coli* fueron las que presentaron mayor número de genes de resistencia en comparación con otras cepas analizadas (*Enterococcus spp*, *C. perfringens*, entre otras). Poirel (2011), identificó cepas de *E. coli* multirresistentes lo cual sospecho que podía deberse a la contaminación post cosecha; ya que en un ambiente abierto la contaminación por contacto es muy recurrente, dado que pueden movilizarse, contaminando las partes externas del vegetal (Poirel, 2011).

Para este estudio, comparando con los estudios en otras partes del mundo como Holanda, Estados Unidos, y otros países de Europa, y tomando en cuenta las matrices analizadas, se ha encontrado baja presencia de genes de resistencia a antimicrobianos, lo cual en cierta medida representa la eficacia de nuestras prácticas de higiene sin embargo, requiere de tomarse con interés y seguir las indicaciones de los organismos como CDC o WHO para minimizar su diseminación.

CONCLUSIONES.

En las 40 muestras compuestas de lechuga y 40 de perejil se identificaron 40 genes de resistencia a antibióticos en perejil (61.53%) y 25 genes de resistencia en lechuga (38.46%).

Los genes con más prevalencia en microbioma total bacteriano fueron *SulI* (resistencia a sulfonamidas) con 15%, *tetA* (resistencia a tetraciclinas de clase A) y *qnrA* (resistencia a fluoroquinolonas de clase A) con 14% cada uno, y *tetB* (resistencia a tetraciclinas de clase B) con 11%

Las cepas de *E. coli*, mostraron bajos niveles de genes de resistencia en comparación con el análisis del microbioma bacteriano.

Doce genes de resistencia a antibióticos se identificaron en las cepas aisladas de *E. coli*; 11 en perejil (91%) y uno en lechuga (9%).

Los genes con más prevalencia en cepas de *E. coli* fueron *tetA* (resistencia a tetraciclinas de clase A) con un 41.67%, seguido de los genes *qnrA* (resistencia a fluoroquinolonas de clase A) y *blaSHV* (resistencia a betalactámicos) con un 16.67%.

Los genes que codifican para la resistencia a carboxipenicilina, colistina y oxacilina no fueron detectados en ninguna muestra.

No se presentaron diferencias ($P>0.05$) entre vegetales para la presencia de genes de resistencia, pero si se observaron diferencias ($P<0.05$) para las cepas de *E. coli* aisladas.

PERSPECTIVAS

Los antibióticos son medicamentos utilizados para prevenir y tratar las infecciones bacterianas, siempre y cuando se utilicen en las medidas indicadas. La resistencia a los antibióticos genera un grave impacto a la salud, así como a las economías de los países, hace que se incrementen los costos médicos, que se prolonguen las estancias hospitalarias y que aumente la mortalidad.

Es necesario que se cambie urgentemente la forma de prescribir y utilizar los antibióticos. Aunque se desarrollen nuevos medicamentos, si no se modifican los comportamientos actuales, la resistencia a los antibióticos seguirá representando una grave amenaza.

Los cambios de comportamiento también deben incluir medidas destinadas a reducir la propagación de las infecciones, a través de la vacunación, el lavado de las manos, la seguridad de las relaciones sexuales y una buena higiene alimentaria.

En lo que respecta a este proyecto, la investigación acerca de la naturaleza en sí de la resistencia a antibióticos, sus medios, mecanismos, factores y desencadenantes, así como sus resultados, es muy necesaria en cuanto se toma en cuenta el alarmante aumento de bacterias con resistencia a antibióticos, y sus respectivas infecciones.

BIBLIOGRAFÍA

Ash, R. J., Mauck, B., & Morgan, M. (2002). Antibiotic resistance of gram-negative bacteria in rivers, United States. *Emerging infectious diseases*, 8(7), 713-716.

Bai Y, Müller DB, Srinivas G, Garrido-Oter R, Potthoff E, Rott M et al. (2015). Functional overlap of the Arabidopsis leaf and root microbiota. *Nature* 528: 364–369.

Bender, C. L., & Cooksey, D. A. (1986). Indigenous plasmids in *Pseudomonas syringae* pv. tomato: conjugative transfer and role in copper resistance. *Journal of Bacteriology*, 165(2), 534-541.

Berendsen, R. L., Pieterse, C. M., & Bakker, P. A. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in plant science*, 17(8), 478-486.

Berg, G., Eberl, L., & Hartmann, A. (2005). The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environmental Microbiology*, 7(11), 1673-1685.

Bergstrom, C. T., M. Lo, and M. Lipsitch. (2004). Ecological theory suggests that antimicrobial cycling will not reduce antimicrobial resistance in hospitals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:13285–13290

Bezanson, G. S., MacInnis, R., Potter, G., & Hughes, T. (2008). Presence and potential for horizontal transfer of antibiotic resistance in oxidase-positive bacteria populating raw salad vegetables. *International journal of food microbiology*, 127(1), 37-42.

Brandl, M. T. (2006). Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety 1. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 44, 367-392.

Boehme, S., Werner, G., Klare, I., Reissbrodt, R., & Witte, W. (2004). Occurrence of antibiotic-resistant enterobacteria in agricultural foodstuffs. *Molecular nutrition & food research*, 48(7), 522-531.

Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, *et al.* (2009). Bad bugs, no drugs: no ESCAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis; 48:1–12.

Buck, J. W., Walcott, R. R., & Beuchat, L. R. (2003). Recent trends in microbiological safety of fruits and vegetables. Plant health progress, 10, 1094.

Canton, R. (2009). Antibiotic resistance genes from the environment: a perspective through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting. Clin. Microbiol. Infect. 15(Suppl. 1):20–25.

CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013. Atlanta, GA: U.S Department of Health and Human Services, CDC. 2013; p.7, 36-7.

Cundon, C., Marey, E., Roldán, F., Canosa Montero, C., Navarro Ocaña, A., Padola, N. L., & Kiernicki, M. C. (2015). Detección y caracterización preliminar de *Escherichia coli* O174 productor de toxina. SNS, 1.

D'Costa, V. M., K. M. McGrann, D. W. Hughes, and G. D. Wright. (2006). Sampling the antibiotic resistome. Science 311:374–37

Demain, A. L., and S. Sanchez. (2009). Microbial drug discovery: 80 years of progress. J. Antibiot. (Tokyo) 62:5–16

Di Cagno, R., Coda, R., De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2013). Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. Food Microbiology, 33(1), 1-10.

Dixon RA, Chopra I. (1986) Polymyxin B and polymyxin B nonapeptide alter cytoplasmic membrane permeability in *Escherichia coli*. J Antimicrob Chemother; 18:557–63.

Doyle, M. P. (2006). Antimicrobial resistance: implications for the food system. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 5:71–137.

Dreser, A., Wirtz, V. J., Corbett, K. K., & Echániz, G. (2008). Uso de antibióticos en México: revisión de problemas y políticas. salud pública de méxico, 50, S480-S487.

Edwards J, Johnson C, Santos-Medellín C, Lurie E, Podishetty NK, Bhatnagar S et al. (2015). Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proc Natl Acad Sci USA* 112: E911–E920.

Erlacher, A., Cardinale, M., Grosch, R., Grube, M., & Berg, G. (2015). The impact of the pathogen *Rhizoctonia solani* and its beneficial counterpart *Bacillus amyloliquefaciens* on the indigenous lettuce microbiome. *The plant microbiome and its importance for plant and human health*, 117.

Finlay, B. B., and R. E. Hancock. (2004). Can innate immunity be enhanced to treat microbial infections? *Nat. Rev. Microbiol.* 2:497–504.

Fluit, A. C., & Schmitz, F. J. (2004). Resistance integrons and super-integrons. *Clinical Microbiology and Infection*, 10(4), 272-288.

Forsman, M., B. Haeggström, L. Lindgren, and B. Jaurin. (1990). Molecular analysis of β -lactamases from four species of *Streptomyces*: comparison of amino acid sequences with those of other β -lactamases. *Microbiology* 136: 589–598.

Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O., & Toussaint, A. (2005). Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 3(9), 722-732.

Funnell, B. E., and G. J. Phillips. (2004). *Plasmid biology*. ASM Press, Washington, DC. Ed. 2

Gaze, W. H., Krone, S. M., Larsson, D. J., Li, X. Z., Robinson, J. A., Simonet, P., ... & Timinouni, M. (2013). Influence of humans on evolution and mobilization of environmental antibiotic resistome. *Emerging infectious diseases*, 19(7).

Geldreich E. & R. Bordner. 1971. Fecal contamination of fruits and vegetables during cultivation and processing for market: a review. *J. Milk Food. Tech.* 34: 184-195.

Hacquard S, Garrido-Oter R, González A, Spaepen S, Ackermann G, Lebeis S et al. (2015). Microbiota and host nutrition across plant and animal kingdoms. *Cell Host Microbe* 17: 603–616.

Heredia, N., Solís-Soto, L., Venegas, F., Bartz, F. E., de Aceituno, A. F., Jaykus, L. A., ... & García, S. (2015). Validation of a novel rinse and filtration method for efficient processing of fresh produce samples for microbiological indicator enumeration. *Journal of Food Protection*®, 78(3), 525-530.

Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews microbiology*, 2(2), 123.

Krumperman, P. H. (1983). Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 46(1), 165-170.

Käsbohrer, A., Lorenz, K., Pfefferkorn, B., Sommerfeld, G.,and Tenhagen, B.A. (2014) *Berichte zur Lebensmittelsicherheit 2012: Zoonosen-Monitoring (8)*. Basel,Switzerland: Springer.

Leff, J. W., & Fierer, N. (2013). Bacterial communities associated with the surfaces of fresh fruits and vegetables. *PloS one*, 8(3), e59310.

Liu, B., and M. Pop. 2009. ARDB—Antibiotic Resistance Genes Database. *Nucleic Acids Res.* 37:D443–D447

Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., Spencer, J., Yu, L. F. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(2), 161-168.

Marti, R., Scott, A., Tien, Y. C., Murray, R., Sabourin, L., Zhang, Y., & Topp, E. (2013). Impact of manure fertilization on the abundance of antibiotic-resistant bacteria and frequency of detection of antibiotic resistance genes in soil and on vegetables at harvest. *Applied and environmental microbiology*, 79(18), 5701-5709.

Mazel, D. (2006). Integrons: agents of bacterial evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 4(8), 608-620.

Mendes, R., Garbeva, P., & Raaijmakers, J. M. (2013). The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS microbiology reviews*, 37(5), 634-663.

Miranda-Estrada, L. I., Ruíz-Rosas, M., Molina-López, J., Parra-Rojas, I., González-Villalobos, E., & Castro-Alarcón, N. (2017). Relación entre factores de virulencia, resistencia a antibióticos y los grupos filogenéticos de *Escherichia coli* uropatógena en dos localidades de México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35(7), 426-433.

Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*, 11(1), 142-201.

Norman, A., L. H. Hansen, and S. J. Sorensen. (2009). Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 364:2275–2289

Ogawara, H., N. Kawamura, T. Kudo, K.-I. Suzuki, and T. Nakase. (1999). Distribution of β -lactamases in actinomycetes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:3014–3017

van Overbeek, L. S., van Doorn, J., Wickers, J. H., van Amerongen, A., van Roermund, H. J., & Willemsen, P. T. (2015). The arable ecosystem as battleground for emergence of new human pathogens. *The plant microbiome and its importance for plant and human health*, 24.

Powell, B. J., Purdy, K. J., Thompson, I. P., & Bailey, M. J. (1993). Demonstration of tra+ plasmid activity in bacteria indigenous to the phyllosphere of sugar beet; gene transfer to a recombinant pseudomonad. *FEMS microbiology ecology*, 12(3), 195-206.

- Pearson, J. S., Giogha, C., Lung, T. W. F., & Hartland, E. (2016). The Genetics of Enteropathogenic *Escherichia coli* Virulence. *Annual Review of Genetics*, 50(1).
- Projan, S. J. (2003). Why is big pharma getting out of antibacterial drug discovery? *Curr. Opin. Microbiol.* 6:427–430.
- Rastogi, G., Sbodio, A., Tech, J. J., Suslow, T. V., Coaker, G. L., & Leveau, J. H. (2012). Leaf microbiota in an agroecosystem: spatiotemporal variation in bacterial community composition on field-grown lettuce. *The ISME journal*, 6(10), 1812-1822.
- Roy, P. H. (1995). Integrons: novel mobile genetic elements mediating antibiotic resistance in enterobacteria and *Pseudomonas*. *APUA Newsletter*, 13(3), 1-4.
- Sampson TR, Liu X, Schroeder MR, Kraft CS, Burd EM, Weiss DS. (2012). Rapid killing of *Acinetobacter baumannii* by polymyxins is mediated by a hydroxyl radical death pathway. *Antimicrob Agents Chemother*; 56:5642–9
- Schwaiger, K., Helmke, K., Hölzel, C. S., & Bauer, J. (2011). Antibiotic resistance in bacteria isolated from vegetables with regards to the marketing stage (farm vs. supermarket). *International journal of food microbiology*, 148(3), 191-196.
- Sierra, A. (2014). «El fascinante microbioma humano (qué es y por qué es importante que lo sepas)
- Slayton, R. B., Turabelidze, G., Bennett, S. D., Schwensohn, C. A., Yaffee, A. Q., Khan, F., & Laufer, A. S. (2013). Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O157: H7 associated with romaine lettuce consumption, 2011. *PLoS One*, 8(2), e55300.
- Sommer, M. O. A., G. Dantas, and G. M. Church. (2009). Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora. *Science* 325:1128–1131.
- Sorensen, S. J., M. Bailey, L. H. Hansen, N. Kroer, and S. Wuertz. (2005). Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:700–710.

Springman, A. C., D. W. Lacher, G. Wu, N. Milton, T. S. Whittam, H. D. Davies, and S. D. Manning. (2009). Selection, recombination, and virulence gene diversity among group B streptococcal genotypes. *J. Bacteriol.* 191: 5419–5427

Vaz-Moreira, I., Nunes, O. C., & Manaia, C. M. (2014). Bacterial diversity and antibiotic resistance in water habitats: searching the links with the human microbiome. *FEMS microbiology reviews*, 38(4), 761-778.

Wang, R. F., Cao, W. W., & Cerniglia, C. E. (1997). A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. *Journal of applied microbiology*, 83(6), 727-736.

World Health Organization. 2018. Antibiotic resistance. Nota descriptiva emitida el 5 de febrero del 2018. Liga <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>

Zeigler, R. G. 1993. Vegetables, fruits and carotenoides and the risk of cancer. *Am. J. Clin. Nut.* 53: 251-259.

Zhu, B., Chen, Q., Chen, S., & Zhu, Y. G. (2017). Does organically produced lettuce harbor higher abundance of antibiotic resistance genes than conventionally produced?. *Environment international*, 98, 152-159.

ANEXOS

Figuras.

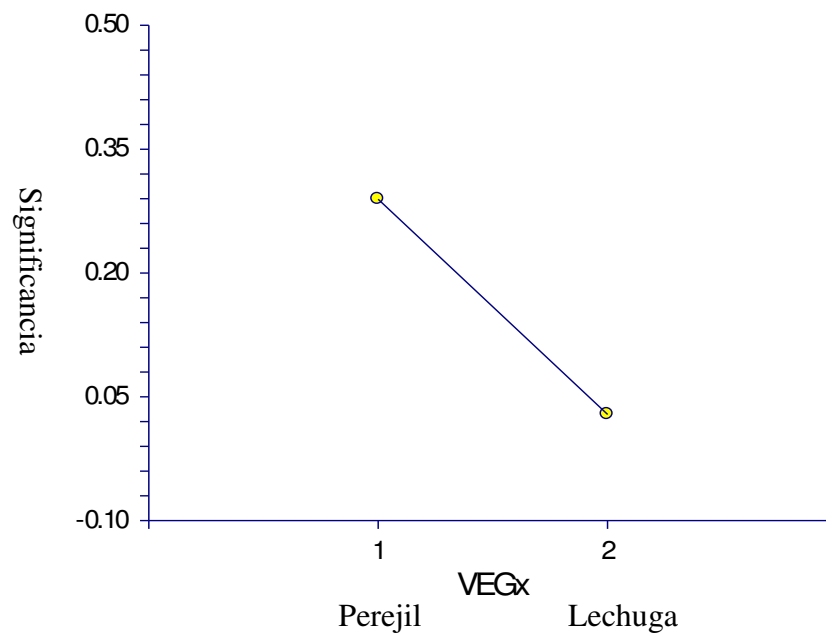
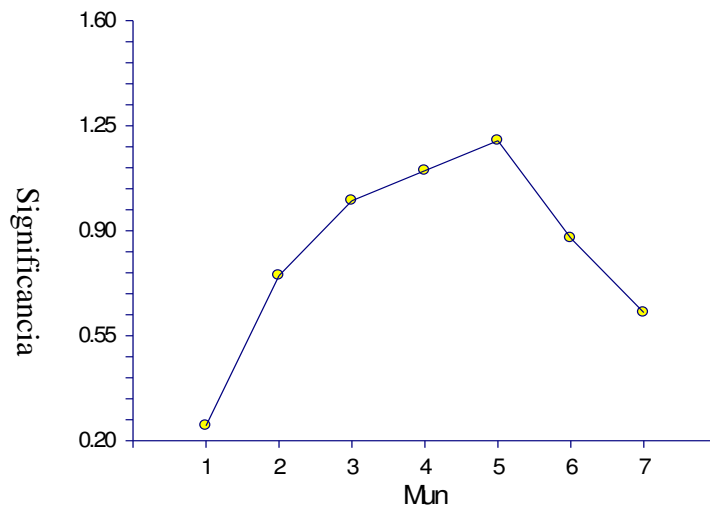


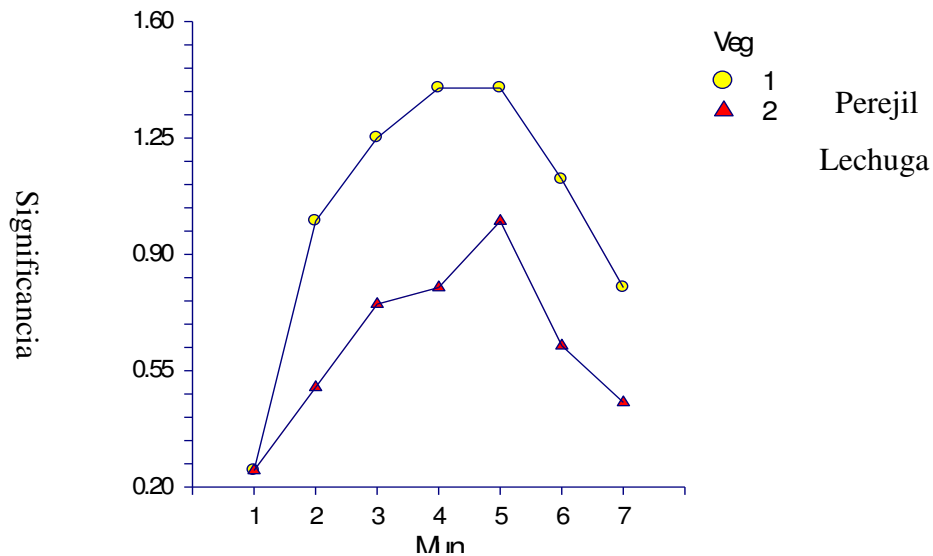
Figura 5. Significancia de genes de resistencia por tipo de vegetal del resistoma bacteriano del microbioma total.



*Municipios: 1.- San Pedro, 2.- Santa Catarina, 3.- Escobedo, 4.- San Nicolás, 5.- Apodaca, 6.- Guadalupe, 7.- Monterrey

Figura 6.

Significancia de genes de resistencia por municipio en resistoma bacteriano de microbioma total.



*Municipios: 1.- San Pedro, 2.- Santa Catarina, 3.- Escobedo, 4.- San Nicolás, 5.- Apodaca, 6.- Guadalupe, 7.- Monterrey

Figura 7. Significancia de genes de resistencia identificados por municipio y por tipo de vegetal en resistoma bacteriano de microbioma total.

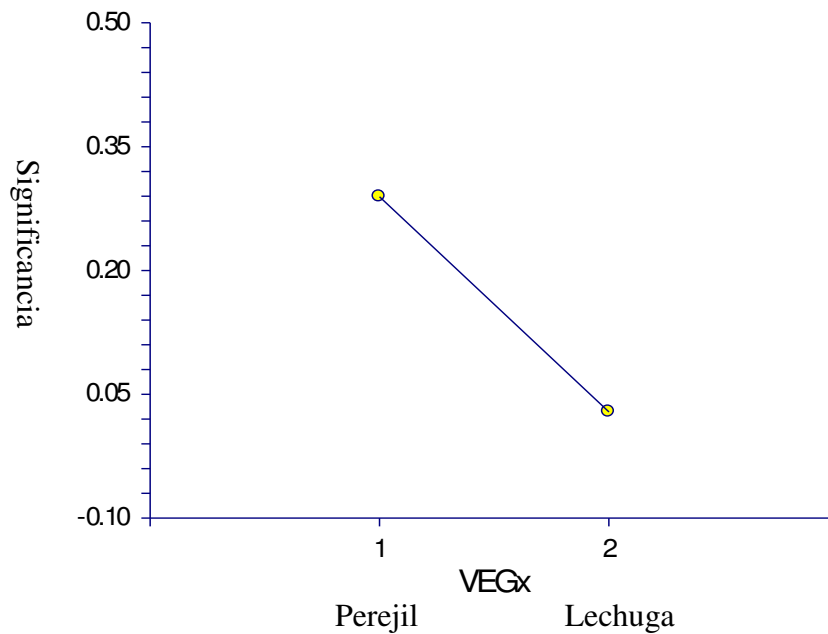
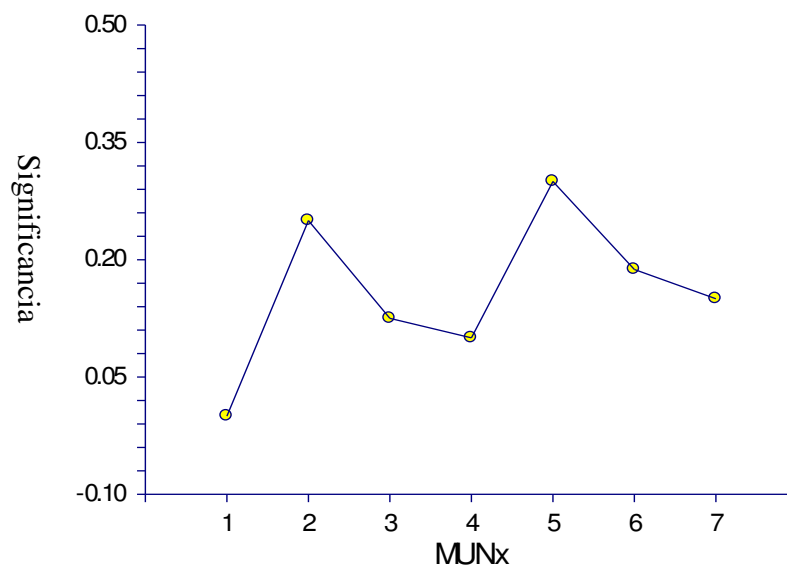
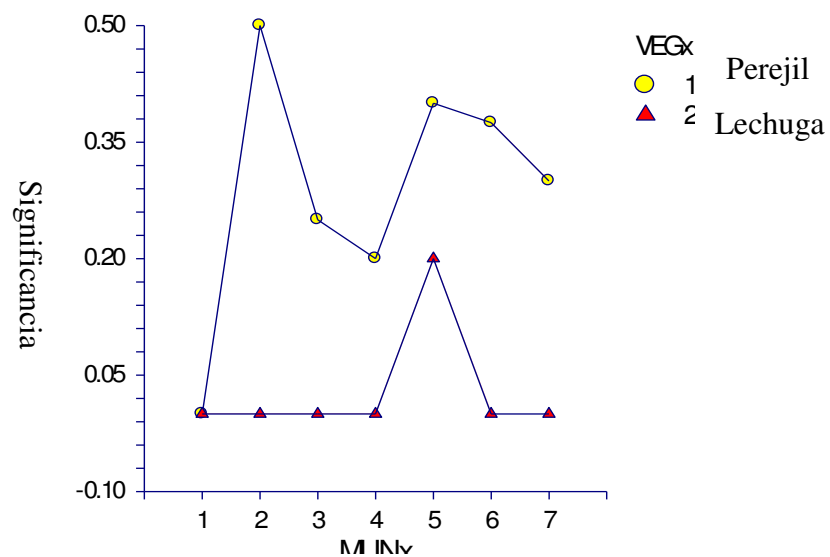


Figura 8. Significancia de genes de resistencia por tipo de vegetal en cepas de *E. coli* aisladas



***Municipios: 1.- San Pedro, 2.- Santa Catarina, 3.- Escobedo, 4.- San Nicolás, 5.- Apodaca, 6.- Guadalupe, 7.- Monterrey**

Figura 9. Significancia de genes de resistencia por tipo de vegetal



*Municipios: 1.- San Pedro, 2.- Santa Catarina, 3.- Escobedo, 4.- San Nicolás, 5.- Apodaca, 6.- Guadalupe, 7.- Monterrey

Figura 10. Significancia de genes de resistencia por tipo de vegetal y municipios.

Tablas.

Tabla 3. Análisis Tukey-Kramer para tipo de vegetal en resistoma bacteriano de microbioma

Análisis de Tukey –Kramer, comparación entre tipos de vegetal			
Alfa=0.050 Term=S(AB) DF=67 MSE=0.8399593 Valor Crítico=2.8228			
Grupo	Conteo	Significancia	Dif. Sig.
2	41	0.6256493	--
1	40	1.032143	--

Grupos: 1.- Perejil, 2.- Lechuga

Tabla 4. Análisis Tukey-Kramer para municipios en resistoma bacteriano de microbioma

Análisis de Tukey –Kramer, comparación entre municipios			
Alfa=0.050 Term=S(AB) DF=67 MSE=0.8399593 Valor Crítico=4.2988			
Municipio	Conteo	Significancia	Dif. Sig
1	8	0.25	--
7	21	0.6272727	--
2	8	0.75	--
6	16	0.875	--
3	8	1	--
4	10	1.1	--
5	10	1.2	--

Municipios: 1.- San Pedro, 2.- Santa Catarina, 3.- Escobedo, 4.- San Nicolás, 5.- Apodaca, 6.- Guadalupe, 7.- Monterrey

Tabla 5. Análisis Tukey-Kramer por tipo de vegetal en resistoma de cepas de *E. coli* aisladas

Análisis de Tukey –Kramer, comparación entre tipos de vegetal			
Grupo	Conteo	Significancia	Dif. Sig.
2	40	2.86E-02	1
1	40	0.2892857	2

Grupos: 1.- Perejil, 2.- Lechuga

Tabla 6. Análisis Tukey-Kramer para municipios en resistoma de cepas de *E. coli* aisladas

Análisis de Tukey –Kramer, comparación entre municipios			
Alpha=0.050 Term=S(AB) DF=66 MSE=0.1291667 Critical Value=4.3008			
Grupo	Conteo	Significancia	Dif. Sig,
1	8	1.11E-16	--
4	10	0.1	--
3	8	0.125	--
7	20	0.15	--
6	16	0.1875	--
2	8	0.25	--
5	10	0.3	--

Municipios: 1.- San Pedro, 2.- Santa Catarina, 3.- Escobedo, 4.- San Nicolás, 5.- Apodaca, 6.- Guadalupe, 7.- Monterrey

RESUMEN BIOGRÁFICO

Dante Aldhair Betancourt Mejorado

Candidato para el grado de
Maestría en Ciencias con orientación en Microbiología

Tesis: PERFIL RESISTÓMICO EN MICROBIOMA DE LECHUGA (*lactuca sativa*) Y PEREJIL (*petroselinum crispum*).

Campo de estudio: Microbiología en alimentos.

Datos Personales: Nacido en Galeana, Nuevo león el 11 de marzo de 1992, hijo de Severo Betancourt y Baldramina Mejorado.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Licenciado en Ciencia de alimentos en 2013.

Experiencia profesional: Practicante de Investigación y desarrollo en PICSA de México en 2013, Inspector de calidad en AJEMEX en 2014, Coordinador de calidad y supervisor de producción en Almacenes Refrigerantes S.A. de C. V. en 2015, Asesor en soporte técnico zona norte en SEGMAN S.A. de C.V., Consultor en sistemas de Seguridad Alimentaria en Food World Consulting Group en 2018

Artículos publicados: Betancourt Mejorado, D. A., García Arellano, A. R., Vázquez Rodriguez, J. A., Núñez González, M. A., Báez González, J. G., & Amaya Guerra, C. A. 2016. EVALUACIÓN DEL IMPACTO DE LA INGESTA DE ARÁNDANO SOBRE LOS NIVELES DE COLESTEROL, GLUCOSA Y TRIGLICÉRIDOS EN RATAS WISTAR ALIMENTADAS CON DIETAS RICAS EN LÍPIDOS. Investigación y desarrollo en Ciencia y Tecnología de alimentos. 1(1) p551-555.